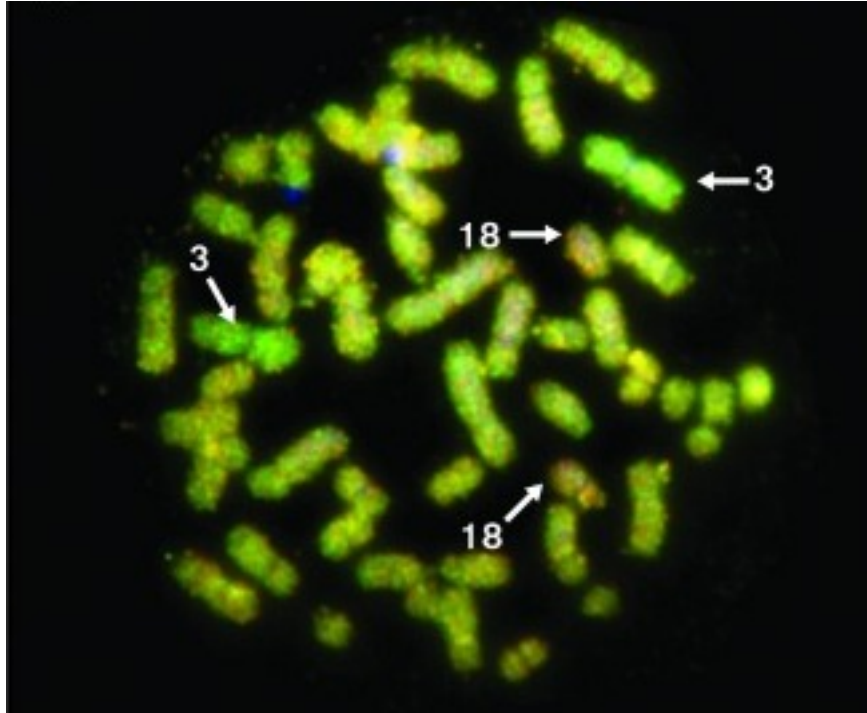


## Diagnòstic genètic preimplantacional amb una tècnica ràpida d'hibridació genòmica comparada

**03/2011 - Biologia.** En aquesta tesi doctoral s'ha desenvolupat una nova variant de la Hibridació Genòmica Comparada (CGH), que redueix dràsticament el temps d'hibridació. Aquesta tècnica, aplicada al Diagnòstic Genètic Preimplantacional, ofereix una anàlisi completa de tots els cromosomes i permet obtenir els resultats molt més ràpid i amb la mateixa eficiència que amb la CGH convencional, de manera que els embrions cromosòmicament normals seleccionats poden ser transferits a l'úter matern en el mateix cicle de la fecundació in vitro sense haver de criopreservar-los.



Imatges de la hibridació d'un embrió de sexe femení que presenta pèrdua del cromosoma 3 i guany del cromosoma 18.

El Diagnòstic Genètic Preimplantacional (PGD) permet seleccionar, dins un programa de fecundació in vitro (FIV), embrions lliures d'alteracions cromosòmiques per a la transferència a l'úter matern. Actualment, la metodologia més freqüentment utilitzada per a aquesta finalitat és l'anàlisi d'un blastòmer dels embrions en el tercer dia del seu desenvolupament mitjançant la Hibridació in situ Fluorescent (FISH), que tan sols permet estudiar de manera rutinària nou dels 24 tipus diferents de cromosomes existents. Una tècnica alternativa menys emprada és la Hibridació Genòmica Comparada (CGH), que permet fer una anàlisi citogenètica completa de tot el cariotip. Es basa en establir una hibridació competitiva entre un DNA control amb cariotip 46,XY i un DNA problema, en proporció 1:1 i marcats amb fluorescències verda i vermella, respectivament, sobre metafases de limfòcits euploides. Els resultats s'avaluen amb un programa informàtic que integra els valors de les fluorescències hibridades i permet determinar si hi ha guanys o pèrdues de material cromosòmic en el DNA estudiat. Aquesta metodologia, però, és força complexa i requereix un temps major que la duració del cicle de FIV per obtenir els resultats, de manera que els embrions analitzats s'han de criopreservar i transferir en un altre cicle addicional, fet que en molts casos afecta la viabilitat dels embrions biopsiats.

L'objectiu d'aquesta tesi doctoral ha estat desenvolupar i aplicar una metodologia de CGH ràpida en què el temps d'hibridació s'ha reduït de 72 hores a 12 hores, de manera que no sigui necessària la criopreservació dels embrions analitzats.

Per a la seva posada a punt, s'han analitzat fibroblasts aïllats de línies cel·lulars amb alteracions cromosòmiques conegudes, el resultat de CGH ràpida dels quals ha confirmat en tots els casos la presència d'aquestes alteracions.

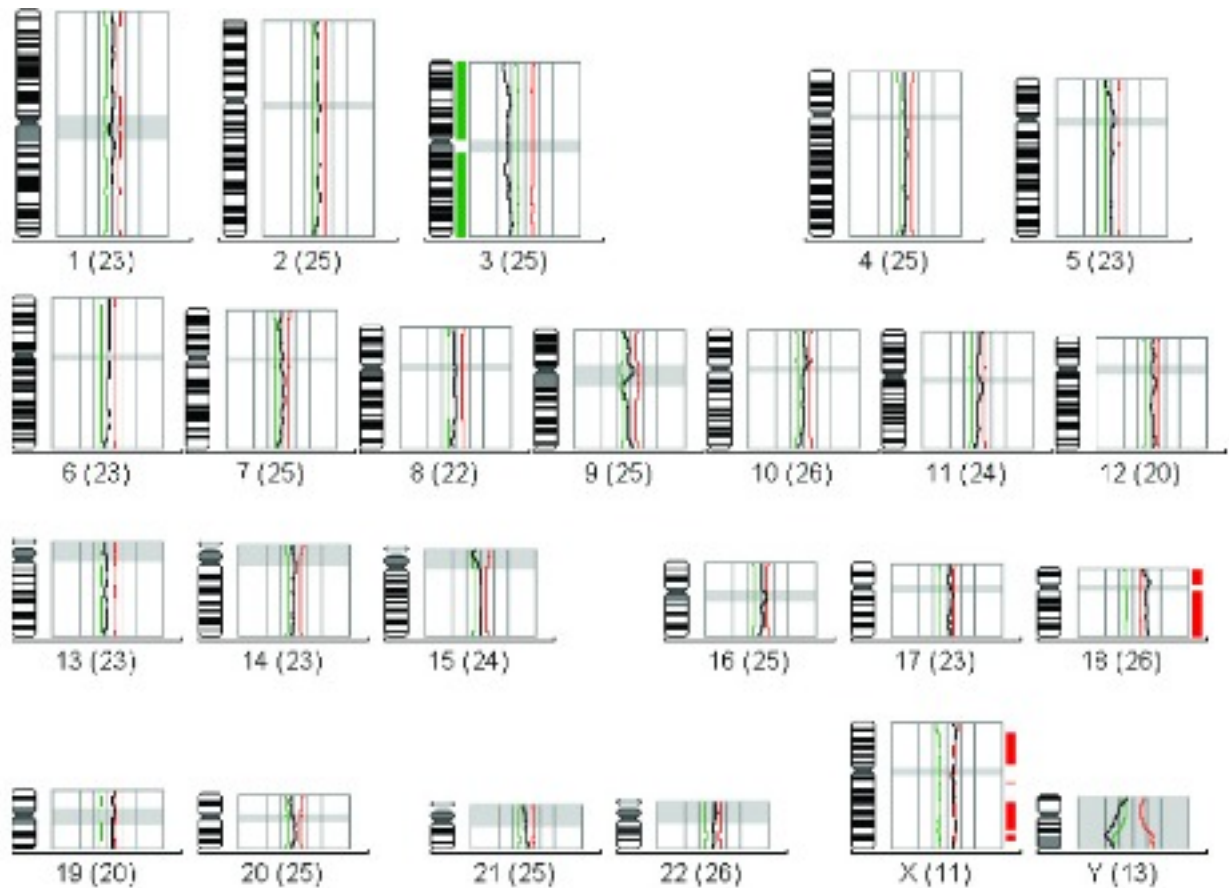
Un cop desenvolupat el protocol de CGH ràpida, s'ha adaptat i validat per a l'anàlisi de blastòmers, emprant embrions descartats de casos de PGD mitjançant FISH amb nou sondes per als cromosomes 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X i Y (FISH-9-cr). Aquesta anàlisi ha posat de manifest que les discordances entre els resultats de la CGH ràpida i els de la FISH-9-cr són degudes principalment a l'existència de mosaïcisme, és a dir, a la presència de diferents línies cel·lulars pel que fa al seu cariotip en un mateix embrió, però també a errors de la FISH.

La CGH ràpida també s'ha utilitzat per fer l'anàlisi de 22 embrions de pacients d'edat materna avançada descartats del PGD amb FISH-9-cr. Aquest estudi ha revelat la presència d'aneuploidies o errors cromosòmics numèrics (el 38,5% dels quals no s'haurien detectat mitjançant la FISH) i d'errors cromosòmics estructurals (en el 31,8% dels embrions), així com de mosaïcisme (en el 77,3% dels embrions) en els diferents blastòmers analitzats.

Un cop demostrada la seva fiabilitat, la tècnica s'ha aplicat clínicament per al cribatge d'aneuploidies en casos d'edat materna avançada, d'avortaments de repetició i de fallades repetides d'implantació, en els quals s'ha obtingut una taxa d'implantació dels embrions transferits del 60%.

Prèvia comprovació que la CGH ràpida era capaç de detectar desequilibris parcials de cromosomes amb un límit de resolució de 10-20Mb, aquesta metodologia s'ha aplicat en el PGD de portadors de translocacions cromosòmiques Robertsonianes (tres casos, quatre cicles de FIV-PGD), recíproques (dos casos, tres cicles de FIV-PGD) i un cas d'una doble translocació (tres cicles de FIV-PGD), en els quals s'ha obtingut un elevat èxit de diagnòstic i dos embarassos. En els casos de translocacions, la CGH ràpida permet estudiar la segregació dels cromosomes implicats en la reorganització, alhora que la resta de cromosomes de la cèl·lula.

La variant de CGH desenvolupada, doncs, permet estudiar tots els cromosomes de la cèl·lula i detectar-hi tant alteracions numèriques com estructurals en un sol procediment que, degut a la reducció del temps d'hibridació, és compatible amb la transferència en fresc dels embrions seleccionats. Per tant, la seva implementació pot incrementar la taxa d'implantació dels embrions transferits després del PGD.



Anàlisi de CGH del cariotip d'un embrió femení. La pèrdua del cromosoma 3 i el guany del cromosoma 18 queden reflectits amb la integració de les fluorescències.

Mariona Rius i Mas

Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia

"Hibridació Genòmica Comparada ràpida: aplicació al Diagnòstic Genètic Preimplantacional". Tesi doctoral de Mariona Rius i Mas (2010). Directores: Joaquina Navarro Ferreté, Jordi Benet Català i Maria Oliver Bonet.